

Communication

Note sur le titrage des vaccins péripneumonie. Nouvelle approche d'un vieux problème, essais préliminaires

F. Thiaucourt¹

A. Di Maria¹

THIAUCOURT (F.), DI MARIA (A.). Note sur le titrage des vaccins péripneumonie. Nouvelle approche d'un vieux problème, essais préliminaires. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, 42 (3) : 389-391.

Le titrage des vaccins contre la péripneumonie contagieuse bovine se fait habituellement en tubes ; on effectue tout d'abord une série de dilutions au dixième de la suspension à titrer puis on ensemence d'autres tubes à partir de chacune des dilutions. Cette méthode n'est pas très précise ou nécessite la manipulation d'une très grande quantité de tubes. La nouvelle technique proposée repose sur une première série de dilution au demi réalisées en parallèle dans une plaque de microtitration. La croissance des mycoplasmes peut être facilement appréciée, après 6 à 9 jours d'incubation, par le virage d'un indicateur coloré. Cette technique est plus rapide et précise et le résultat est alors obtenu par une moyenne, affectée d'une certaine précision, ce qui permet d'effectuer des comparaisons entre titrages qui soient statistiquement significatives. *Mots clés* : Péripneumonie contagieuse bovine - Vaccin - Méthode.

Le contrôle de qualité d'un vaccin contre la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est basé essentiellement sur la numération des germes vivants qu'il contient. De même, toute tentative d'amélioration de ces vaccins passe par des numérations à chaque étape de la fabrication afin d'apprécier le titre initial et les pertes successives (lyophilisation, stockage, remise en suspension...).

La méthode habituellement employée est celle décrite à l'annexe 3 du rapport FAO sur la peste bovine et les vaccins mixtes (2). Elle consiste à effectuer des dilutions successives au 10ème puis d'ensemencer 5 tubes à partir de chacune des dilutions finales. Le titre est obtenu par la table de Taylor qui donne le titre le plus probable en fonction du résultat obtenu.

Or cette technique se révèle assez imprécise, ce qui a conduit à en développer une autre qui soit à la fois plus rapide à mettre en oeuvre et surtout plus précise.

Origine de l'imprécision

La consultation des rapports d'activité du National Veterinary Institute (NVI) des années précédentes montre que l'imprécision des titrages avait déjà été

observée à l'époque (3, 4). L'explication habituellement donnée était une hétérogénéité de la suspension de mycoplasmes ou bien la présence d'agrégats qui, en se dissociant au fur et à mesure des dilutions, fausseraient les résultats. Les différences d'un titrage à l'autre (moyenne sur 3 essais) faits par deux opérateurs différents allaient jusqu'à plus de 0,3 log.

En fait, les disparités observées tiennent sans doute en grande partie à la méthode elle-même. La technique se décompose en deux temps :

1. une série de dilutions de 10 en 10,
2. l'ensemencement de cinq tubes à partir des dernières dilutions.

Erreurs au niveau des dilutions

Une dilution au 10ème représente en fait un tirage au sort ; on prélève 1 ml sur 10 et la densité dans ce ml doit être représentative de celle qui existe dans le tube. Ceci n'est vrai que pour de fortes densités. Dès que la densité est voisine ou inférieure à 10, le prélèvement n'est plus représentatif.

Prenons par exemple un tube de 10 ml contenant 150 mycoplasmes, un prélèvement de 1 ml doit théoriquement en contenir 15 mais en fait il y a beaucoup de chances qu'il en contienne 13, 14, 15, 16 ou 17. A la dilution suivante, le ml prélevé en contiendra certainement 1 ou 2 mais il est aussi possible qu'il en contienne 0 ou 3 !

Erreurs au niveau de l'ensemencement des 5 tubes

Les mêmes imprécisions ont lieu. Si la densité est faible, un prélèvement de 1 ml a de fortes chances de ne pas contenir de mycoplasme. Pour reprendre l'exemple précédent, si le premier tube contient 150 mycoplasmes :

— les cinq prélèvements de 1 ml dans ce premier tube contiendront certainement des mycoplasmes, et donc les cinq tubes ensemencés seront positifs 5+. Résultats pour la dilution considérée : 5+/5 tubes ;

— le deuxième tube en contient 13 à 17 soit une densité théorique de 1 ou 2/ml. Mais, du fait du hasard, il y a alors de fortes chances pour qu'un prélèvement, ou même deux, ne contiennent aucun mycoplasme ; parmi les 5 tubes ensemencés 1 ou 2 resteront stériles. Résultats pour la dilution considérée : 5+/5, 4+/5 ou 3+/5 ;

— le troisième tube en contient de 0 à 3 soit une densité de 0 ou rarement 1 ml. Il peut donc raisonnablement y avoir de 1 à 2 prélèvements qui contiennent des mycoplasmes. Résultats pour la dilution considérée : 2+/5 ou 1+/5 ou 0+/5.

1. National Veterinary Institute, P.O. Box 379, Debre Zeit, Éthiopie.

Reçu le 17.12.88, accepté le 27.01.89.

Communication

Pour une densité connue au départ, 15 mycoplasmes/ml, on voit que le résultat du titrage peut varier de 5-5-2 à 5-3-0, ce qui correspond dans la table de Taylor à des densités estimées entre 54 et 7,9 mycoplasmes par ml !

Sachant la méthode entachée d'imprécision, on peut améliorer les résultats en effectuant plusieurs numérations et en prenant la valeur moyenne. Dans ce cas, il ne faut pas oublier qu'une moyenne doit toujours s'accompagner d'un intervalle de confiance qui se calcule par la formule :

$$M \pm (t s)/\sqrt{n}$$

où t est donné par les tables statistiques pour un risque donné (ici on prendra le risque 5 p. 100) et pour un certain degré de liberté ($n-1$) ; s est l'écart-type, et n le nombre d'essais.

Si l'on ne fait que 3 titrages, l'intervalle est égal à 2,5 s et si l'on admet que s est voisin de 0,2 log, l'intervalle est donc de $\pm 0,5$ log. Si l'on fait 6 titrages, cet intervalle n'est réduit qu'à $\pm 0,23$ log.

Chaque titrage représente la manipulation de 30 tubes. La comparaison de plusieurs suspensions de mycoplasmes, dont la densité est voisine, demanderait une quantité énorme de tubes si l'on veut que les différences mesurées soient statistiquement valables. En pratique, cela est impossible. Cette technique ne pourra donc mettre en évidence que des différences de titre, qui sont grandes, de l'ordre de 0,5 log.

Nouvelle méthode

Une première façon d'améliorer les titrages consiste à faire, d'une part, des dilutions plus faibles à partir d'un certain niveau et à augmenter, d'autre part, le nombre de tubes ensemencés. Cette approche est proposée pour le titrage sur oeuf des vaccins contre la maladie de Newcastle (1). Dans le cas de la PPCB, si l'on effectue des dilutions au 5ème à partir de la dilution 10^{-7} et si l'on ensemence 7 tubes, la précision que l'on obtient est de l'ordre de 0,25 log pour une moyenne de trois titrages. Cela nécessite alors la manipulation de 133 tubes par suspension à titrer, ce qui est excessif.

La méthode proposée ici associe une série de dilutions au 10ème effectuées en tubes puis l'utilisation de plaques de microtitration pour faire des séries parallèles de dilutions au 1/2.

Les dilutions au 10ème doivent s'arrêter pour que l'on ait une densité assez forte, de l'ordre de 10^3 Myc/ml. En effet, on prélève alors 100 μ l (qui contiennent environ 100 mycoplasmes) et on les répartit dans la première colonne d'une plaque de microtitration stérile dont les puits contiennent déjà 100 μ l de milieu de numération. Des dilutions successives au 1/2 sont

réalisées jusqu'à la fin de la plaque à l'aide d'une pipette multicanaux. La gamme de dilution ainsi réalisée représente $12 \times (\log 2) = 3,6$ log. Chaque série de dilution est effectuée en 8 exemplaires parallèles. Le milieu de numération employé est le milieu « glucose » utilisé pour les tests biochimiques, la seule différence étant une concentration un peu plus forte en rouge phénol qui permet une meilleure visualisation du virage dans les puits. N'importe quel autre milieu peut être utilisé, à condition que l'on dispose d'un système de révélation de la croissance des mycoplasmes. Les plaques sont recouvertes d'un papier auto-collant qui permet d'éviter la dessiccation du milieu, l'utilisation du milieu « glucose » permet une visualisation directe sans avoir à enlever ce papier auto-collant car l'acidification fait virer la couleur du milieu au jaune.

La lecture des plaques s'effectue entre le cinquième et le neuvième jour après l'ensemencement, le titre définitif est acquis lorsqu'aucun nouveau puit positif n'apparaît d'un jour sur l'autre sur la plaque. Le titre pour chaque rangée est donné par la formule :

$$T = T_0 + 1 + x \log 2$$

où T_0 est la dilution finale en tube exprimée en log ; 1 est dû au prélèvement de 0,1 ml ; x est le nombre de puits positifs.

Les moyennes sur les 8 rangées sont affectées d'un intervalle de confiance de 0,83s (s.t./ \sqrt{n} ; ici $n = 8$, $t = 2,36$).

Résultats

Un point délicat de la méthode concerne les microdilutions ; il importe de ne pas introduire de bulle dans les embouts des pipettes. Celles-ci provoquent des erreurs dans les volumes délivrés et empêchent un bon mélange dans le liquide qui se trouve coincé au-dessus. Un peu de pratique permet d'éviter ce genre d'écueil et les écarts-types obtenus sont de l'ordre de 0,15 à 0,3 log, ce qui correspond à des précisions de l'ordre de 0,12 à 0,25 log.

Conclusion

La nouvelle méthode donne des précisions qui sont nettement meilleures que celles obtenues avec la méthode traditionnelle. Son avantage supplémentaire est sa rapidité qui permet d'effectuer de nombreux titrages en un temps réduit. Ces avantages sont décisifs si l'on veut comparer plusieurs suspensions dont les titres sont voisins, ou si l'on veut comparer un nombre important d'échantillons, (faire des courbes de croissance pour différents milieux par exemple), et pouvoir tirer des conclusions qui soient statistiquement valables.

THIAUCOURT (F.), DI MARIA (A.). Note on CBPP vaccine titration. Old problem, new approach. Preliminary experiments. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 389-391.

A new technique is proposed for the titration of live vaccines against contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Presently, the one most widely used, combines a set of tenfold dilutions with the seeding of five tubes with samples taken from each of these latter. This technique is not very accurate or it requires a great number of tubes to increase its accuracy. The new technique starts with the same tenfold dilutions but after a relevant dilution, samples of 100 µl are put into the eight wells of the first column of a microtitration plate and then with « glucose » medium. After a 6 to 9 days incubation time, the growth can be recorded by an indicator change of color. This technique is much faster and seems to be more precise. Furthermore the eight parallel titrations enable the results to be expressed by means and comparison of results can be statistically meaningful. *Key words*: Contagious bovine pleuropneumonia - Vaccine - Technique.

Bibliographie

1. ALLAN (W. H.), LANCASTER (J. E.), TOTH (B.). Vaccins contre la maladie de Newcastle. Rome, FAO, 1980. (Coll. FAO Production et Santé animales n° 10).
2. FAO. Rapport FAO sur la peste bovine et les vaccins mixtes. 15-19 octobre 1984. Rome, FAO, 1984.
3. National Veterinary Institute. Rapport d'activité. Debre Zeit, Éthiopie, NVI, 1973.
4. National Veterinary Institute. Rapport d'activité. Debre Zeit, Éthiopie, NVI, 1974.

Note on an association of *Clostridium novyi* type A and *Clostridium sordellii* with a case of gas-gangrene in a Zebu cow

S. M. El Sanousi ¹

M. T. Musa ²

EL SANOUSI (S. M.), MUSA (M. T.). Note sur une association de *Clostridium novyi* type A et *Clostridium sordellii* dans un cas de gangrène gazeuse chez une vache Zébu. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 391-392.

Les auteurs décrivent un cas de myosite à gangrène gazeuse sur une vache Zébu avec association de *Clostridium novyi* type A et *Clostridium sordellii*. La présence simultanée de ces deux organismes dans la même lésion est une rareté. Le diagnostic différentiel avec le charbon symptomatique est difficile en l'absence d'examen bactériologiques. Une cause, d'origine iatrogène, est probable et l'introduction de spores par le matériel d'injection lors des campagnes de masse contre le charbon symptomatique ne peut être écartée. L'animal guérit complètement après injection intramusculaire de TerramycineND pendant 4 jours successifs. *Mots clés*: Vache - Zébu - Myosite à gangrène gazeuse - *Clostridium sordellii* - *C. novyi* type A - Infection iatrogène - Soudan.

1. Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, King Faisal University, Kingdom of Saudi Arabia.

2. Ministry of Animal Resources, Khartoum, Sudan.

Reçu le 30.01.89, accepté le 28.02.89.

In Darfur Province (Western Sudan) a four-year Zebu cow went lame suddenly. On clinical examination the animal had a firm palpation of the right quarter which was painful to the touch and had a crepitant sound. An area of two inches in diameter was shaved and disinfected with 70 p.100 alcohol. On parenthesis coloured serous exudate containing bubbles of gas was collected. The fluid was cultured on reinforced clostridial agar enriched with 10 p.100 defibrinated sheep blood agar. The plates were incubated in BTL anaerobic jar under an atmosphere of hydrogen and carbon dioxide (5:1 v/v) generated by a gas generating kit (Oxoid), at 37 °C for 48 hours.

Two types of colonies were recovered and designated A and B. Type A colonies were thin and had a tendency for swarming with rhizoidal margins. Type B colonies were lozenge-shape with the long axis following the direction of streaking. These colonies were raised with ridged contours, crenated with tentacular margins and were surrounded by a clear zone of haemolysis. The two organisms were Gram-positive and had cylindrical, central to subterminal spores.

The biochemical properties were conducted according to COWAN (1). Both organisms produced lecithinase enzyme which was inhibited by antisera on the half-plate antitoxin medium (5). Moreover, organism A produced lipase enzyme demonstrated by a « pearly » layer. Confirmatory tests for organism A including gas liquid chromatography were kindly conducted by the Institute of Plant Production and Animal Health in the Tropics and Subtropics, University of Göttingen, West Germany. This revealed 86.8 p.100 butyric acid, 5.1 p.100 isobutyric acid, 4 p.100 propionic acid, 3.2 p.100 isovaleric acid and 0.8 p.100 valeric acid. The organism was finally diagnosed as *Clostridium novyi* type A. The synergistic haemolysis test of GUBASH (2) was conducted for organism B and was diagnosed as *Clostridium sordellii*.

Each of these two organisms is occasionally involved in cases of clostridial myositis which is well recognized as a cause of death in cattle (4). However, the occurrence of both organisms in one lesion was rarely reported. The case under study was clinically indistinguishable from blackleg, but bacteriologically the case turned to be gangrenous myositis. The differential diagnosis of the two conditions is difficult on clinical grounds, especially when there is no history of trauma. The incidence took place in an area where blackleg disease prevails. Mass vaccination is routinely practiced and hence apparent iatrogenic infection could not be overruled (3). Moreover, the site of isolation of both organisms is unusual. The intramuscular route injection, when not properly practiced, might lead to the introduction to clostridial spores.